

Paris 1970

ORSAY  
Série A  
N° d'ordre : 705

SPECIFICITE DU SYSTEME ENZYMATIQUE DE C-METHYLATION  
DES DESMETHYLMENAQUINONES DANS UN EXTRAIT ACELLULAIRE  
DE Mycobacterium phlei.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Physiques enregistrée au C. N. R. S. sous le numéro AO 5054.

SAMUEL-CHAUVEL Odile

Soutenue le 21 octobre 1970, à la Faculté des Sciences d'Orsay, devant le jury :

MM. E. LEDERER, Président

M. VILKAS

V. LUZZATI

R. AZERAD



ORSAY  
Série A  
N° d'ordre : 705

SPECIFICITE DU SYSTEME ENZYMATIQUE DE C-METHYLATION  
DES DESMETHYLMENAQUINONES DANS UN EXTRAIT ACELLULAIRE  
DE Mycobacterium phlei.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat ès Sciences Physiques enregistrée au C. N. R. S. sous le numéro AC 5054.

SAMUEL-CHAUVEL Odile

Soutenue le 21 octobre 1970, à la Faculté des Sciences d'Orsay, devant le jury :

MM. E. LEDERER, Président

M. VILKAS

V. LUZZATI

R. AZERAD



## C-méthylation des desméthylménaquinones :

### II. Spécificité du système enzymatique de méthylation de *Mycobacterium phlei* vis-à-vis du substrat quinonique.

O. SAMUEL (\*) et R. AZERAD.

*Institut de Biochimie, Université de Paris XI, Centre d'Orsay, 91 - Orsay, (France).  
(1-12-1971).*

**Summary.** — When tested with demethylmenaquinone analogs systematically modified in the ring or in the side chain, the methylating enzyme turned out to be highly specific towards the naphthoquinonic ring and the first isoprenoid *trans* unit : any change (saturation, hydroxylation, substitution of hydrogen or methyl groups,...) led generally to complete loss of activity. The enzyme was remarkably less specific towards the remainder of the side chain : this could be interpreted as the result of a necessary interaction between the enzyme and a substrate dissolved into phospholipidic micelles. A change in the phospholipid composition led to a change of the methylation pattern of homologous DMK. Moreover the influence of the phospholipidic environment on the chemical reactivity of the 2-position of DMK was demonstrated. This peculiarity of DMK methylase is discussed with respect to its localization in the bacterial membrane.

La méthylation des desméthylménaquinones peut être considérée comme une des deux voies possibles dans les étapes finales de la biosynthèse des ménaquinones, l'autre alternative étant l'alkylation de la ménadione. Dès 1954 [1] Birch postula que des réactions de transméthylation pouvaient avoir lieu sur un carbone insaturé. De nombreux travaux effectués sur l'ubiquinone ont prouvé que le méthyle en - 2 provenait d'une transméthylation à partir de la méthionine par l'intermédiaire de la S-adénosyl-méthionine [2, 3, 4]. En ce qui concerne les ménaquinones, Martius et Leuzinger [5] ont montré que *Fusiformis nigrescens* utilisait la L-(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)-méthionine pour synthétiser une ménaquinone-9. En même temps, Guérin et coll. obtenaient le même résultat pour la II-dihydroménaquinone-9 de *M. phlei* et localisaient la radioactivité dans le méthyle-2 par dégradation [6]. Jaureguiberry et coll. [7] ont utilisé la (CD<sub>3</sub>)-méthionine et ont démontré que le méthyle s'incorporait *in toto* dans le méthyle-2 de la ménaquinone.

Dans un article précédent [8], les premiers résultats concernant la méthylation enzymatique par un extrait acellulaire de *M. phlei* de différentes desméthylménaquinones ont été décrits. Cette étude qui avait pour objet l'influence de la longueur de la chaîne isoprénœide, a révélé que le maximum de méthylation était obtenu pour des substrats comportant 3 ou 4 chaînons isoprénœides et que la desméthylménaquinone-1 n'était pas mé-

thylée. Des travaux effectués dans notre laboratoire [9] afin de purifier la méthylase de *M. Phlei* se sont révélés partiellement infructueux. D'autre part les desméthylménaquinols ne se sont pas montrés meilleurs substrats pour la méthylation que les desméthylménaquinones [10]. Nous avons donc approfondi notre étude sur la spécificité de l'enzyme de méthylation en continuant à utiliser d'une part l'extrait enzymatique dont la préparation à partir de *M. phlei* a été décrite précédemment [11] et d'autre part les desméthylquinones comme substrats. Les homologues et analogues structuraux des DMK (\*\*) précédemment préparés [12] ont été incubés avec l'extrait acellulaire de *M. phlei* en vue d'étudier leur méthylation par la L-(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)-méthionine en présence d'ATP.

#### MATERIEL ET METHODES.

##### 1) DISSOLUTION DES DMK DANS LES MICELLES DE PHOSPHOLIPIDES.

Les micelles de lécithines sont préparées par sonication de 400 mg de lécithines de soja dans 20 ml de tampon tris 0,1 M, pH 7,8, contenant 1,15 p. cent KCl pendant 10 minutes. Cette suspension est ensuite centrifugée une heure et demie à 75 000 g [8]. La solution micellaire obtenue contient en moyenne 15 mg/ml de phospholipides. Les DMK, 30 mM dans le dioxane, sont solubilisées à raison de 3 µmoles par ml de micelles par sonica-

(\*) Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques de M<sup>me</sup> O. SAMUEL, soutenue le 21 octobre 1970 à la Faculté des Sciences d'Orsay et enregistrée au C.N.R.S. sous le numéro AO 5054.

(\*\*) Abréviations : ménaquinone-9 : MK-9 ; II-dihydroménaquinone-9 : MK-9 (II-H<sub>2</sub>) ; 2-desméthylménaquinone-9 : DMK-9. Cf. *Biochim. Biophys. Acta* 107 (1965) 5.

tion pendant 15 minutes à 20° puis on centrifuge à 12 000 g pendant 25 minutes de façon à obtenir une solution micellaire limpide. Les DMK sont dosées soit par spectrophotométrie ultraviolette dans l'alcool à 251 nm ( $\epsilon = 19\,000$ ) contre un blanc de même concentration micellaire, soit par comparaison des spectres oxydé et réduit par  $\text{KBH}_4$  ( $\Delta \epsilon = 32\,700$ ) à 245 nm [13].

## 2°) CONDITIONS D'INCUBATION.

Les incubations ont été effectuées à 30° pendant 1 heure avec 5 ml, 10 ml, 15 ml ou 30 ml de surnageant dialysé [11]. Le milieu d'incubation contient pour 1 ml de surnageant :  $\text{MgCl}_2$ , 70  $\mu\text{moles}$  ; acétate d'ammonium, 2  $\mu\text{moles}$  ; L-( $^{14}\text{CH}_3$ )-méthionine (Act. spéc. : 24,6 mCi/mmole), 0,05  $\mu\text{Ci}$  ; ATP, 3  $\mu\text{moles}$  ; DMK, 0,05  $\mu\text{mole}$  en solution dans 0,03 ml de suspension micellaire de phospholipides.

Après incubation, les quinones ont été extraites et purifiées par chromatographie d'adsorption sur plaques de gel de silice G (Merck) [6]. Les composés élués ont été ensuite chromatographiés sur papier imprégné de vaseline à l'aide d'un mélange acétone-eau, saturé de vaseline (solvant A, 9:1 ; solvant B, 95:5 ; solvant C, 97:3). Les chromatogrammes sont découpés transversalement en bandes de 1 cm et chacune d'elles est immergée dans 13 ml de solution scintillante (4 g de PPO, 300 mg de POPOP par litre de toluène) et comptée à l'aide d'un compteur à scintillation Packard Tri-Carb 3314.

## 3°) CONTRÔLE DE L'INCORPORATION DANS LES QUINONES MÉTHYLÉES.

Lorsque le radiochromatogramme sur papier révèle un pic radioactif au niveau de la quinone, nous effectuons le contrôle suivant : une partie aliquote de l'extrait purifié sur plaque est chromatographiée sur papier et la bande radioactive obtenue au même Rf que la quinone témoin est découpée et élue. Une moitié de l'éluat est chromatographiée sur plaque préparative (solvant : benzène) avec 1,5  $\mu\text{mole}$  d'entraîneur ; au niveau de la quinone élue et comptée on doit retrouver la radioactivité de départ. L'autre moitié est soumise à irradiation ultraviolette pendant 1 h dans le cyclohexane puis chromatographiée de la même manière avec 1,5  $\mu\text{mole}$  d'entraîneur ; l'absence de radioactivité au niveau de la quinone démontre l'incorporation du méthyle-( $^{14}\text{CH}_3$ ) dans la quinone isolée.

## 4°) PRÉPARATION DE LA DESMÉTHYLPHYLLOQUINONE HYDROGÉNÉE.

Elle a été obtenue par hydrogénation catalytique de la desméthylphyllloquinone en présence de pal-

ladium sur charbon et purifiée par chromatographie préparative sur papier vaseliné. Le papier découpé en face du témoin de desméthylphyllloquinone hydrogénée a été élué à l'éther. L'éluat a été chromatographié deux fois sur plaque de silicagel (solv. benzène) pour éliminer la vaseline. Nous avons obtenu ainsi 4  $\mu\text{moles}$  de desméthylphyllloquinone hydrogénée qui ont été dissoutes dans 1 ml de micelles.

## 5°) PRÉPARATION DE LA 1'- $^3\text{H}_2$ -DESMÉTHYLPHYLLOQUINONE. Séparation des isomères *cis* et *trans*.

### *Trans*-1'- $^3\text{H}_2$ -phytol.

Une expérience à froid a montré la nécessité d'utiliser 0,5 mole de  $\text{NaBH}_4$  pour obtenir la réduction rapide et quantitative de 1 mole de phyténal (obtenu par oxydation du phytol par  $\text{MnO}_2$  dans l'éther de pétrole [14] : 220 mg (0,75 mmole) de *trans*-phyténal sont donc dissous dans 4 ml d'éthanol-eau 95:5 et traités par 0,042 mmole de  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (act. spéc. 600 mCi/mmole) dissous dans 0,2 ml de butylamine + 1 ml d'eau. Après agitation 10 minutes à température ordinaire, on ajoute 11,7 mg (0,3 mmole) de  $\text{NaBH}_4$  froid dissous dans 1 ml d'eau + 3 ml d'éthanol. On agite 30 minutes à température ordinaire. On décompose l'excès de  $\text{NaBH}_4$  par HCl 10 p. cent (15 ml), on extrait à l'éther et lave avec une solution saturée de chlorure de sodium. Le phytol est chromatographié sur une colonne de 20 g de gel de silice et élué à l'hexane contenant 7 à 10 p. cent d'éther. Activité spécifique : 62 mCi/mmole.

Un contrôle chromatographique sur couche mince (solvant : benzène-méthyléthylcétone, 8:2) indique la présence de moins de 1 p. cent d'impuretés radioactives.

### *Cis,trans* 1'- $^3\text{H}_2$ -desméthylphyllloquinone.

A une solution de 640 mg (4 mmoles) de 1,4-naphtohydroquinone et 148 mg (0,5 mmole) de 1'- $^3\text{H}_2$ -phytol (activité spécifique diluée à 11 mCi/mmole) dans 4 ml de dioxanne, on ajoute à 50° sous azote 0,2 ml d'éthérate de trifluorure de bore dissous dans 1,5 ml de dioxanne [12]. Le mélange est agité 1 h 30 à 55° puis extrait. Après purification sur plaque épaisse de silicagel dans le système hexane-méthyléthylcétone 9:1, on obtient 150 mg de DMK tritiée d'une pureté supérieure à 99 p. cent (activité spécifique : 11,2 mCi/mmole). L'analyse par chromatographie sur couche mince à développement multiple (5 à 7 fois) dans les systèmes : D, hexane-oxyde de butyle 97:3 ; E, hexane-oxyde d'isopropyle 97:3 ; F, hexane-oxyde d'isopropyle 98,5:1,5 montre la présence de *cis* et de *trans* DMK mais aucun des systèmes

chromatographiques utilisés ne permet la séparation complète des isomères [12].

*Époxydes cis et trans de la 1'-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>-desméthylphyllloquinone.*

10 mg de desméthylphyllloquinone froide (23 µmoles) et 2,5 mg de desméthylphyllloquinone tritiée (act. spéc. 11,2 mCi/mmmole) sont mis en

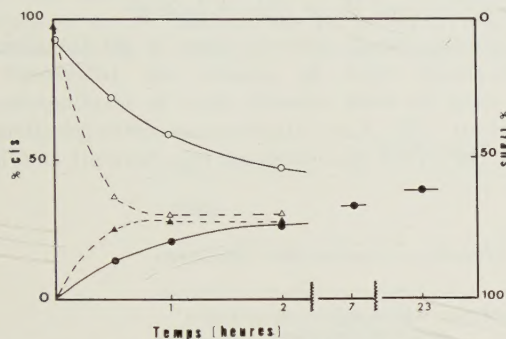


FIG. 1. — Interconversion des ménaquinones ▲ — — — ▲ et des époxydes de desméthylménaquinones — ● — ● sous l'influence de la lumière.

solution dans 1 ml d'acétone et 1 ml d'éthanol absolu et traités par 0,1 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 p. cent en volume (Perhydrol Merck) et 0,05 ml de carbonate de sodium 5 p. cent. On tiédit 2 minutes au

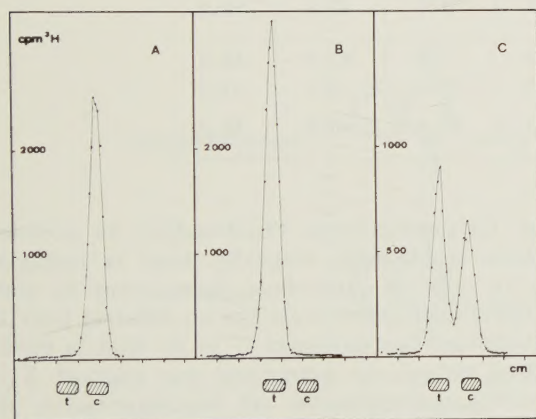


FIG. 2. — Séparation des isomères cis et trans des époxydes de desméthylphyllloquinones-<sup>3</sup>H.

Radiochromatogrammes de contrôle effectués sur couche mince dans le solvant D (cinq migrations successives).

A : époxyde cis.

B : époxyde trans.

C : époxyde fraction intermédiaire.

bain-marie à 40° jusqu'à disparition de la coloration puis on laisse 15 minutes à température ordinaire. On extrait à l'éther, lave au KCl saturé, sèche et évapore. L'huile incolore obtenue est

chromatographiée sur plaque épaisse avec cinq migrations dans le système D. L'action de la lumière blanche sur chacun des isomères purifiés ayant montré une interconversion possible (fig. 1) jusqu'à un équilibre contenant 40 p. cent de composé cis et 60 p. cent de composé trans sans destruction notable de ces isomères, les préparations ultérieures de l'isomère cis ont été effectuées sur un mélange d'époxydes brut préalablement irradié pendant 12 heures. La purification de chaque isomère est effectuée ensuite par chromatographie préparative comme indiqué ci-dessus et leur pureté est contrôlée par radiochromatographie [15] (figure 2).

*Réduction des époxydes cis et trans en 1'-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>-desméthylphyllloquinones cis et trans.*

*Première méthode.*

Environ 30 mg d'époxyde trans (ou cis) dans 2 ml d'acide acétique et 20 mg de zinc sont agités 3 h à 37° à l'obscurité. On ajoute de l'eau et neutralise par du bicarbonate de sodium solide. On extrait à l'éther, lave au bicarbonate, sèche, évapore, oxyde à l'oxyde d'argent dans l'éther et purifie sur plaque épaisse (solvant benzène).

*Deuxième méthode.*

A environ 30 mg d'époxyde de DMK dans 2 ml du mélange méthanol-dioxanne 1:1, on ajoute une solution à 5 p. cent d'hydrosulfite de sodium. Le mélange est agité 3 h à 37° dans l'obscurité puis extrait et oxydé comme précédemment.

*Comparaison des deux méthodes.*

Afin de savoir si la réduction en desméthylphyllloquinone pouvait entraîner une interconversion éventuelle des isomères, les desméthylphyllloquinones tritiées cis et trans obtenues par l'une ou l'autre méthode ont été réépoxydées comme ci-dessus et les époxydes soumis à des radiochromatogrammes.

Les résultats indiquant la répartition des isomères avant et après réépoxydation figurent dans le tableau I. La méthode de réduction par le zinc dans l'acide acétique donne la même répartition des isomères cis et trans après et avant réduction. La réduction par l'hydrosulfite entraîne par contre une certaine interconversion de l'isomère cis en isomère trans ; c'est donc la méthode de réduction par le zinc dans l'acide acétique qui a été adoptée.

6°) ACTION DES THIOLS SUR LES DMK.

a) dans l'alcool tamponné :

A 8,8 µmoles de DMK dans 16 ml d'alcool et 4 ml de tampon tris contenant 1,15 p. cent KCl, on

ajoute 40  $\mu$ moles de cystéine (ou de benzène-thiol). Les densités optiques sont mesurées à des temps donnés à 427 nm sur des prélèvements de 0,5 ml additionné de 0,1 ml d'HCl N. et 2,4 ml d'alcool. L'absorption moléculaire du thioéther est calculée à partir de la densité optique mesurée au palier de fin de réaction :  $\varepsilon_{427 \text{ nm}} = 1840$ .

b) en solution micellaire dans les lécithines :

A 4,4  $\mu$ moles de DMK dans 2 ml de micelles et 8 ml de tampon, on ajoute 20  $\mu$ moles de cystéine. Les densités optiques sont mesurées comme précédemment ; le palier de fin de réaction atteint en 10 minutes avec la DMK-1 donne la même absorption moléculaire.

#### Modifications du noyau naphtoquinonique.

Le remplacement du noyau naphtoquinonique par un noyau benzoquinonique substitué annule totalement l'activité de méthylation. Il en est de même lorsque des changements sont introduits dans le noyau naphtoquinonique par saturation. Les incorporations ont été comparées à celle obtenue dans la phylloquinone (Tableau III).

#### Modifications de la chaîne latérale.

L'incorporation trouvée dans la phylloquinone hydrogénée dans la chaîne est inférieure à 1 p. cent de celle trouvée dans la phylloquinone (Tableau III). La  $\gamma$ -hydroxydesméthylphylloquinone [16] n'est pas méthylée par l'extrait enzyma-

TABLEAU I.

*Influence de la méthode de réduction sur l'interconversion des isomères.*

| Méthode de réduction | Epoxyde de DMK         | Répartition des isomères <i>cis</i> et <i>trans</i> dans les époxydes |                      |                                  |                      |
|----------------------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|
|                      |                        | avant réduction                                                       |                      | après réduction et réépoxydation |                      |
|                      |                        | p. cent <i>cis</i>                                                    | p. cent <i>trans</i> | p. cent <i>cis</i>               | p. cent <i>trans</i> |
| I Zn/AcOH            | <i>cis</i>             | 92,8                                                                  | 7,2                  | 92,0                             | 8,0                  |
|                      | <i>trans</i>           | 2,0                                                                   | 98,0                 | 2,9                              | 97,1                 |
|                      | fraction intermédiaire | 46,7                                                                  | 53,3                 | 47,5                             | 52,5                 |
| II Hydrosulfite      | <i>cis</i>             | 92,8                                                                  | 7,2                  | 87,8                             | 12,2                 |
|                      | <i>trans</i>           | 2,0                                                                   | 98,0                 | 2,7                              | 97,3                 |
|                      | fraction intermédiaire | 46,7                                                                  | 53,3                 | 43,5                             | 56,5                 |

Pour étudier l'action du benzénethiol (très peu soluble en milieu aqueux), il a été nécessaire d'utiliser le mélange réactionnel micelles-tampon-alcool en proportions 2:6:2.

#### RÉSULTATS.

Afin de comparer entre elles différentes séries d'incubations, il a été nécessaire d'incorporer dans chacune d'elles une référence interne, soit la DMK-3 dont la vitesse de méthylation est la plus grande, soit une DMK dont le taux d'incorporation par rapport à la DMK-3 était connu (Tableau II).

Il a été vérifié précédemment avec la desméthylphylloquinone que le taux de méthylation mesuré est maximal aux concentrations de substrat utilisées [8].

tique. La saturation ou l'hydratation du premier chaînon isoprénolide empêche donc la méthylation du substrat quinonique. La quinone 25 dont la chaîne est linéaire n'est pas un substrat pour la méthylation. Les quinones 17 et 19 dont la modification unique ou principale par rapport à la desméthylphylloquinone est la suppression du méthyle du premier chaînon ne sont pas des substrats pour la méthylation. Ceci semble donc indiquer que ce premier méthyle latéral est indispensable pour qu'une DMK soit méthylée. L'absence totale de méthylation des quinones 22 et 24 qui présentent une méthylation supplémentaire soit en 2' soit en 1' démontre la nécessité d'un premier chaînon isoprénolide intact. Cependant cette condition n'est pas suffisante puisque la DMK-1 n'est pas méthylée [8]. Un chaînon isoprénolide intact suivi d'une chaîne lipophile pourrait donc être la condition nécessaire et suffisante pour qu'une

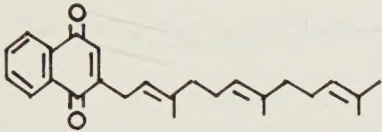
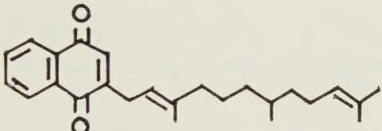
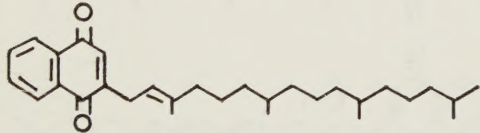
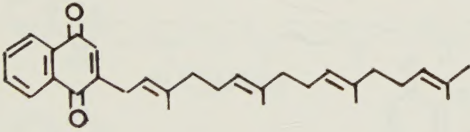
DMK soit un substrat de méthylation. Une vérification en est donnée par l'incorporation notable dans la méthylquinone obtenue à partir de *11a* qui présente un premier chaînon intact suivi d'une chaîne droite en C<sub>12</sub> (Tableau III).

Il était intéressant de tester l'effet de la substitution du méthyle du premier chaînon par une chaîne plus longue. Les premiers essais effectués avec les quinones *11e*, *11f* et *11d* (Tableau IV) analogues de la DMK-4, de la desméthylphyloquinone ou de la quinone *11a*, ont montré qu'en

Géométrie *cis,trans* de la double liaison du premier chaînon isoprénøide.

Les quinones utilisées pour les expériences d'incorporation précédentes sont toutes des mélanges 2'3'-*cis* et *trans*. Les résultats précédents ayant montré l'importance du premier chaînon isoprénøide, il était intéressant de connaître les incorporations obtenues à partir de l'un ou l'autre des isomères géométriques d'une quinone s'étant révélée substrat pour la méthylation. La desméthylphyloquinone a été choisie pour cette étude car

TABLEAU II.  
C-Méthylation des DMK de référence.

| DMK                        | Formule                                                                             | P. cent incorporation |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| DMK-3                      |    | 100                   |
| DMK-3 (II-H <sub>2</sub> ) |   | 104 ± 24 (*) (3) (**) |
| DM phyloquinone            |  | 60 ± 14 (12)          |
| DMK-4                      |  | 96 ± 9 (3)            |

(\*) Moyenne ± erreur standard.

(\*\*) Nombre d'expériences.

substituant un radical lauryle au premier méthyle, on annulait toute activité. Les quinones *11b* et *11c* (Tableau V) homologues de la DMK-3 (II-H<sub>2</sub>) ont été alors synthétisées de façon à savoir si une substitution du méthyle par les radicaux éthyle ou propyle permettait aux DMK d'être encore des substrats pour la méthylation. Les résultats du tableau V montrent que seule la substitution par un groupe éthyle permet une incorporation notable.

elle ne possède que cette double liaison et a en même temps une activité satisfaisante (Tableau II).

Le mélange d'isomères de la desméthylphyloquinone préparé à partir de *trans*-phytol contient 18 p. cent d'isomère *cis* et 72 p. cent d'isomère *trans*. Dans la publication précédente il a été montré que ces isomères non séparables directement pouvaient être obtenus à l'état pur par l'intermédiaire de leurs dérivés époxydés [12].

TABLEAU III.  
C-Méthylation des homologues de la desméthylphyllorédoxone.

| DMK (°)                                  | Formule | P. cent incorporation |
|------------------------------------------|---------|-----------------------|
| DM phylloquinone                         |         | 100                   |
| 3                                        |         | 0                     |
| 4                                        |         | 0                     |
| diméthyl-2,3 phytyl-5 benzoquinone-1,4   |         | 0                     |
| DMphylloquinoneH <sub>2</sub>            |         | < 1 (2) (***)         |
| (3'-hydroxy) phytyl-2 naphthoquinone-1,4 |         | 0                     |
| 25                                       |         | 0                     |
| 17                                       |         | 0                     |
| 19                                       |         | 0                     |
| 11a                                      |         | 26 ± 8 (**)(6)        |

TABLEAU III (suite).

| DMK (*) | Formule | P. cent incorporation |
|---------|---------|-----------------------|
| 22      |         | 0                     |
| 24      |         | 0                     |

(\*) Les chiffres portés dans cette colonne se réfèrent aux quinones figurant dans la seconde colonne et aux préparations décrites dans la précédente publication [12].

(\*\*) Moyenne  $\pm$  erreur standard.

(\*\*\*) Nombre d'expériences.

TABLEAU IV.

| DMK (*) | Formule | P. cent incorporation |
|---------|---------|-----------------------|
| DMK-4   |         | 100                   |
| 11e     |         | 0                     |
| 11f     |         | 0                     |
| 11d     |         | 0                     |

(\*) Les chiffres portés dans cette colonne se réfèrent aux quinones figurant dans la seconde colonne et aux préparations décrites dans la précédente publication [12].

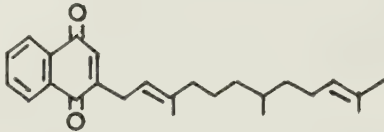
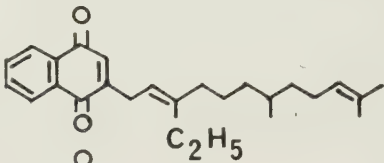
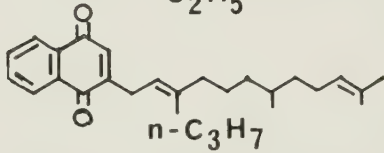
(\*\*) Moyenne  $\pm$  erreur standard.

(\*\*\*) Nombre d'expériences.

Devant la difficulté d'estimer de faibles proportions de chaque isomère contaminant l'autre, et afin de pouvoir contrôler ce taux de contamination, nous avons eu recours à un marquage radio-

actif de chacun de ces isomères combiné à l'analyse chromatographique de chacun d'eux. La desméthylphylloquinone *cis,trans* tritiée a été préparée comme indiqué dans la partie expérimen-

TABLEAU V.

| DMK (*)                   | Formule                                                                           | P. cent incorporation |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| DMK-3(II-H <sub>2</sub> ) |  | 100                   |
| IIb                       |  | 13 ± 4 (**) (2) (***) |
| IIc                       |  | 0                     |

(\*) Les chiffres portés dans cette colonne se réfèrent aux quinones figurant dans la seconde colonne et aux préparations décrites dans la précédente publication [12].

(\*\*) Moyenne  $\pm$  erreur standard.

(\*\*\*) Nombre d'expériences.

tale. L'époxyde du mélange a été obtenu par traitement à l'eau oxygénée en présence de carbonate de sodium [17] et séparé en ses deux isomères. Les radiochromatogrammes de contrôle effectués sur chacun d'eux montrent l'efficacité de cette séparation (fig. 2).

Le problème qui se posait à ce stade était le retour aux isomères desméthylphyllloquinoniques. Alors que la réduction des époxydes par l'hydrosulfite de sodium en milieu hydroalcoolique [18] entraîne une interconversion notable des isomères, l'action du zinc dans l'acide acétique [19] permet le retour aux *cis* et *trans* desméthylphyllloquinones avec un aussi bon rendement (environ 50 p. cent) mais sans interconversion significative des isomères (Tableau I).

L'incubation de l'extrait acellulaire avec les desméthylphyllloquinones *cis* ou *trans* ainsi préparées en présence de L-(<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>)-méthionine a été effectuée dans les conditions habituelles. Après extraction et purification, les radiochromatogrammes sur papier en phase inversée ont donné les résultats consignés dans le tableau VI. Bien que la desméthylphyllloquinone *cis* se soit montrée beaucoup moins active que la desméthylphyllloquinone *trans*, la radioactivité incorporée est loin d'être négligeable. Cette radioactivité pouvait provenir soit

d'une incorporation dans la phylloquinone *cis* avec une utilisation moins efficace de la desméthylphyllloquinone *cis* comme substrat, soit d'une incorporation dans la phylloquinone *trans* provenant de la desméthylphyllloquinone *trans* présente dans la desméthylphyllloquinone *cis* initiale, soit enfin d'une interconversion au niveau des desméthylphyllloquinones ou des phylloquinones pendant l'incubation ou les opérations de purification. L'examen chromatographique de la phylloquinone obtenue (fig. 3) effectué sur les expériences 1B ou 2B montre que la phylloquinone doublement marquée obtenue à partir de la desméthylphyllloquinone *cis* est constituée presque exclusivement de l'isomère *trans*. Ceci permet d'écarter l'hypothèse de l'utilisation de la desméthylphyllloquinone *cis* comme substrat. D'autre part le fait que dans l'expérience n° 2 où il y a 1 p. cent seulement d'isomère *trans* dans la desméthylphyllloquinone *cis* de départ, le pourcentage d'incorporation soit aussi élevé que dans l'expérience n° 1, indique que l'incorporation ne dépend pas de la présence du faible pourcentage d'isomère *trans* initialement présent. Il est possible que le faible pourcentage d'incorporation mesuré avec l'isomère *cis* (1B et 2B) soit dû à une interconversion au niveau des desméthylphyllloquinones sous l'effet d'irradiations accidentelles

TABLEAU VI.  
C-Méthylation des desméthylphyloquinones- $^3\text{H}$  *cis* et *trans*.

|                 | Desméthylphyloquinone       |                                              |                           |                             | Incorporation dans la phyloquinone             |                          |                            |
|-----------------|-----------------------------|----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
|                 | Préparation                 | $\mu\text{moles}/10\text{ ml}$<br>surnageant | P. cent<br>DMK <i>cis</i> | P. cent<br>DMK <i>trans</i> | Incorporation<br>totale<br>dpm $^{14}\text{C}$ | P. cent<br>MK <i>cis</i> | P. cent<br>MK <i>trans</i> |
| Expérience n° 1 | A <i>trans</i>              | 1,0                                          | 2                         | 98                          | 20.600                                         | 4,3                      | 95,7                       |
|                 | B <i>Cis</i>                | 1,0                                          | 96                        | 4                           | 2.150                                          | 1                        | 99                         |
|                 | C <i>cis</i> + <i>trans</i> | 1,07                                         | 13                        | 87                          | 20.800                                         | 1,5                      | 98,5                       |
| Expérience n° 2 | A <i>trans</i>              | 0,74                                         | < 1                       | > 99                        | 88.600                                         | 4,5                      | 95,5                       |
|                 | B <i>cis</i>                | 0,74                                         | 99                        | 1                           | 11.700                                         | traces                   | 100                        |

avant et pendant l'incubation. La vitesse d'interconversion des isomères de desméthylphyloquinones n'a pu être testée en raison de leur fragilité à la lumière. Les radiochromatogrammes montrant la répartition des isomères de desméthylphyloquinones tritiées (courbe tritium) et de phyloquinones doublement marquées (courbe carbone 14) sont reportés sur les figures 3, 4 et 5. Bien que les desméthylphyloquinones *cis* et *trans*

résiduelles ne soient pas complètement séparées, on peut constater l'augmentation après incubation du pourcentage d'isomère *cis* dans la desméthylphyloquinone *trans* et de l'isomère *trans* dans la desméthylphyloquinone *cis* (courbe tritium) ; cette interconversion peut être évaluée à environ 5-10 p. cent. Le fait que nous trouvons 1,5 p. cent d'incorporation dans la phyloquinone *cis* de l'expérience 1C, 4,5 p. cent et 4,3 p. cent dans la phyl-

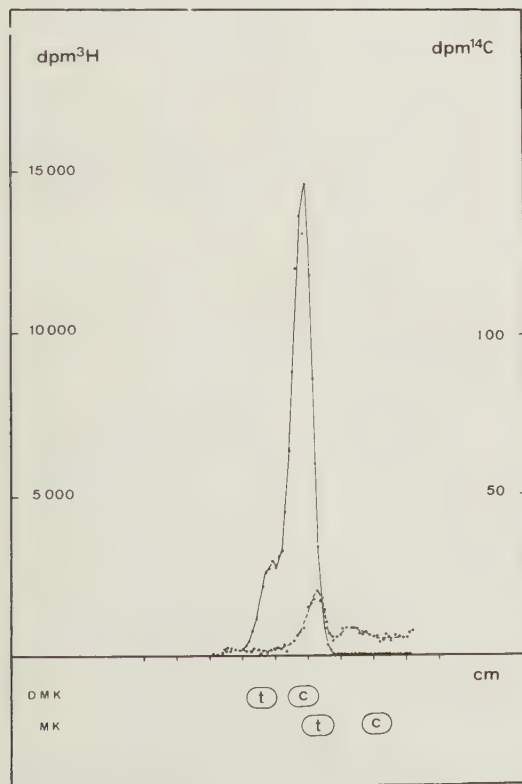


FIG. 3. — C-méthylation de la desméthylphyloquinone- $^3\text{H}$  *cis*.

Radiochromatogramme effectué dans le solvant D (5 migrations successives). (Expérience 1 B) : trait plein, radioactivité  $^3\text{H}$  ; tirets, radioactivité  $^{14}\text{C}$ .



FIG. 4. — C-méthylation de la desméthylphyloquinone- $^3\text{H}$  *trans*.

Radiochromatogramme effectué dans le solvant D (5 migrations successives). (Expérience 1 A) : trait plein, radioactivité  $^3\text{H}$  ; tirets, radioactivité  $^{14}\text{C}$ .

loquinone *cis* des expériences 1A et 2A alors que la desméthylphyloquinone *cis* n'est pas un substrat, indique aussi une interconversion au niveau des phyloquinones lors des opérations de purification. De plus le Tableau VI montre la même activité pour la desméthylphyloquinone synthétique (*cis* + *trans*) et la desméthylphyloquinone *trans* pure bien que celle-là ne contienne que 82 p. cent d'isomère *trans* ; ceci découle du fait que les incorporations sont effectuées en présence de substrat quinonique en concentration bien supérieure à celle de la saturation [8] et indique aussi qu'à ces concentrations la desméthylphyloquinone *cis* n'exerce pas d'inhibition sur la méthylation de la desméthylphyloquinone *trans*.

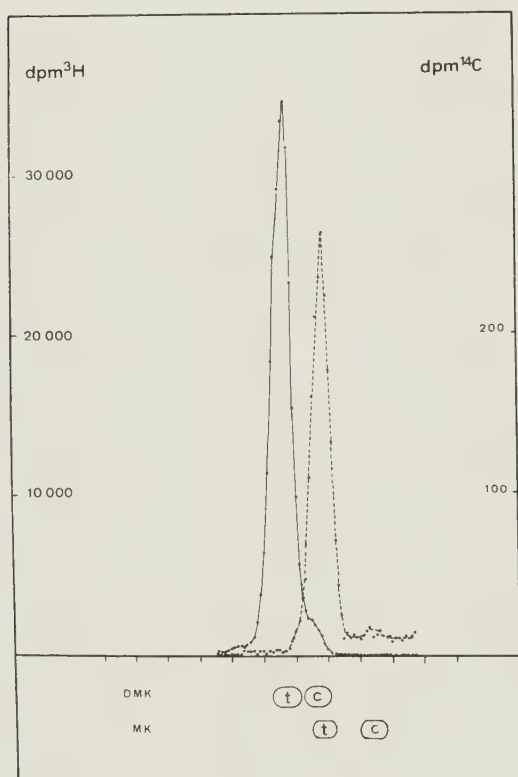


Fig. 5. — C-méthylation de la desméthylphyloquinone- $^3\text{H}$  (*cis* + *trans*).

Radiochromatogramme effectué dans le solvant D (5 migrations successives). (Expérience 1 C) : trait plein, radioactivité  $^3\text{H}$  ; tirets, radioactivité  $^{14}\text{C}$ .

Les autres DMK comportant de 10 à 30 p. cent de composé *cis* [12] n'ont pas été étudiées de ce point de vue. On peut penser que l'isomère *cis* n'est pas substrat ; quant à la stéréochimie des autres doubles liaisons, il est probable qu'elle n'intervient pas dans la réaction étant donné que seul

le premier chaînon isoprénoïde est essentiel, et que la saturation des autres chaînons affecte peu l'activité.

## DISCUSSION.

L'enzyme de méthylation semble très spécifique du noyau naphtoquinonique et du premier chaînon isoprénoïde *trans*. Toute modification de ce premier chaînon, disparition de la double liaison, disparition du méthyle ou remplacement par une longue chaîne, substitution des hydrogènes 1' et 2' par un méthyle, inversion de la géométrie de la double liaison, entraîne la perte d'activité vis-à-vis des substrats de méthylation. La substitution du méthyle 3' par un groupe éthyle diminue considérablement l'activité. La substitution par un groupe propyle l'annule.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus par Popjak et coll. [20] sur la prényltransférase qui catalyse la réaction de condensation de l'isopentényl pyrophosphate avec le 3,3-diméthylallylpyrophosphate ou le géranyl pyrophosphate. Dans ce cas aussi, alors que le méthyle *trans* du diméthylallylpyrophosphate ne peut être substitué que par un groupe éthyle, le méthyle *cis* peut être remplacé par des groupes éthyle, n-propyle, géranyle et 6,7-dihydrogéranyle. Cette analogie de spécificité tout à fait remarquable semble être propre aux réactions enzymatiques intervenant sur un substrat isoprénoïde mais la signification biologique en est encore inconnue.

Il peut paraître surprenant que le maximum d'activité du système enzymatique de méthylation soit obtenu avec des substrats comportant 3 ou 4 chaînons isoprénoïdes alors que la ménaquinone naturelle en possède neuf. D'autre part la DMK-1 n'est pas substrat. Étant donné le mode de solubilisation utilisé, on peut penser que la chaîne lorsqu'elle est plus longue qu'un chaînon isoprénoïde sert à maintenir la DMK dans un milieu phospholipidique favorable à la réaction, phénomène qui rendrait compte de la spécificité bien moins grande de l'enzyme vis-à-vis du reste de la chaîne et éventuellement du pic d'activité observé si la structure des micelles formées est plus favorable à la méthylation des DMK à 3 ou 4 chaînons. Une fraction phospholipidique purifiée de *M. phlei* (contenant le mélange cardiolipides, phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidylinositol oligomannosides dans les proportions 50:10:40 [21]) a été utilisée pour la préparation des micelles à la place des lécithines de soja. Les DMK de différentes longueurs de chaîne ont été solubilisées dans ces

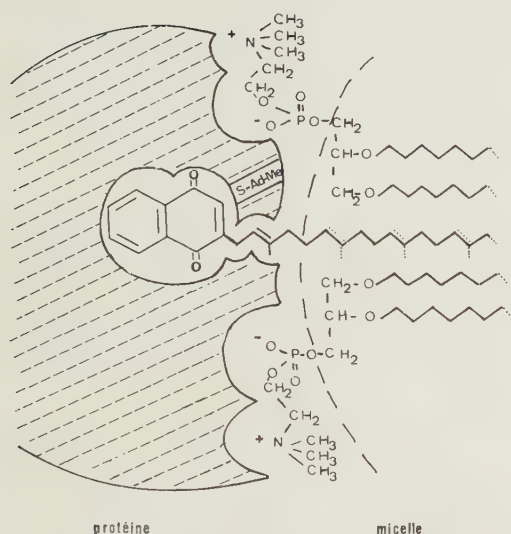


Schéma 1

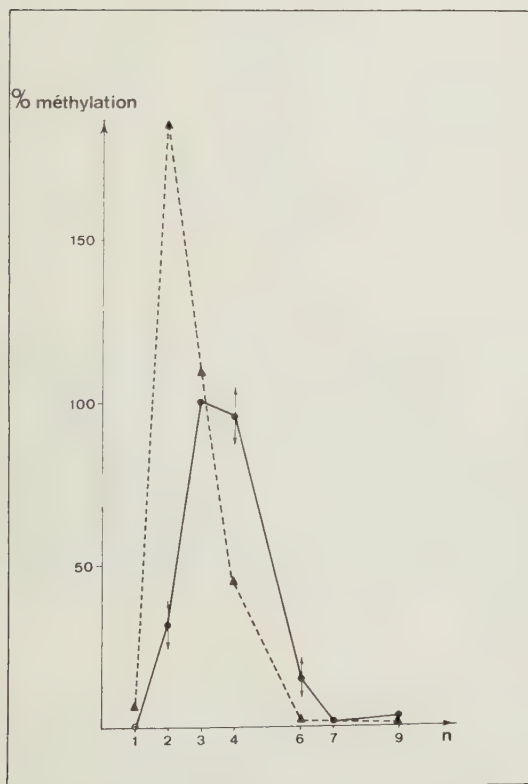


FIG. 6. — C-Méthylation des DMK-n.

● — ● en solution micellaire dans les lécithines.  
 ▲ — ▲ en solution micellaire dans les phospholipides de *M. phlei*.

micelles et incubées avec l'extrait enzymatique en présence de L-( $^{14}\text{CH}_3$ )-méthionine et d'ATP. La courbe d'incorporation obtenue (fig. 6) indique un déplacement du maximum d'activité vers les chaînes plus courtes (DMK-2). Ce résultat montre le rôle de l'environnement micellaire dans la réaction de méthylation. La modification de l'activité observée à la suite d'un changement du milieu micellaire plaide en faveur d'une interaction possible entre les chaînes des DMK et les chaînes paraffiniques des phospholipides impliqués dans la structure micellaire. On peut imaginer un modèle (schéma 1) dans lequel la chaîne des DMK à l'exception du premier chaînon isoprénolide s'intercale entre les chaînes paraffiniques [22, 23, 24], le premier chaînon étant disponible à l'extérieur de la micelle pour l'interaction avec l'enzyme agissant à la surface de celle-ci. Cette hypothèse est nécessaire pour expliquer la spécificité étroite de l'enzyme vis-à-vis de la structure du premier chaînon et rend compte également de la non-méthylation de la DMK-1 dont la chaîne isoprénolide trop courte empêche l'ancrage dans le milieu hydrophobe. Ce schéma rend compte également de la non-méthylation de la DMK-*cis* dont la position du noyau, tout à fait différente par rapport à la surface de la micelle, empêche l'interaction avec l'enzyme.

Nous avons pensé pouvoir tester directement cet engagement différent des chaînes dans la structure micellaire en mesurant la réactivité de la position-2, — celle même où s'effectue la réaction de méthylation —, vis-à-vis des thiols : la cystéine, par exemple, réagit avec les naphtoquinones monosubstituées pour donner des thioéthers présentant une bande caractéristique entre 420 et 430 nm [25, 26]. La figure 7 montre les constantes de vitesse du premier ordre de la réaction de la cystéine (en excès) avec les DMK. La courbe A représente cette réaction effectuée dans l'éthanol et indique une réactivité à peu près indépendante de la longueur de la chaîne. La courbe B indique les résultats obtenus en milieu aqueux lorsque les DMK sont solubilisés dans les micelles de lécithines. La constante de vitesse est dix fois plus grande pour la DMK-1, ce qui est conforme à la réactivité des DMK dans un tel milieu [27] ; au contraire, la réactivité des autres DMK est fortement diminuée. Un résultat analogue est obtenu en remplaçant la cystéine par le benzénethiol (courbe C).

Ces expériences montrent que la réactivité propre du noyau naphtoquinonique en position -2 est masquée en présence des micelles de lécithines. Ceci peut être interprété comme résultant de l'en-

gagement des chaînes isoprénoïdes dans la structure micellaire, phénomène qui réduit la probabilité de rencontre des DMK avec la cystéine, celle-ci étant de plus repoussée par les charges des molécules de lécithines orientées à la surface de la micelle. Cet engagement par contre favoriserait la méthylation enzymatique en permettant le contact du noyau naphtoquinonique et du premier chaînon isoprénoïde avec les sites correspondants d'une protéine enzymatique située à la surface micellaire.

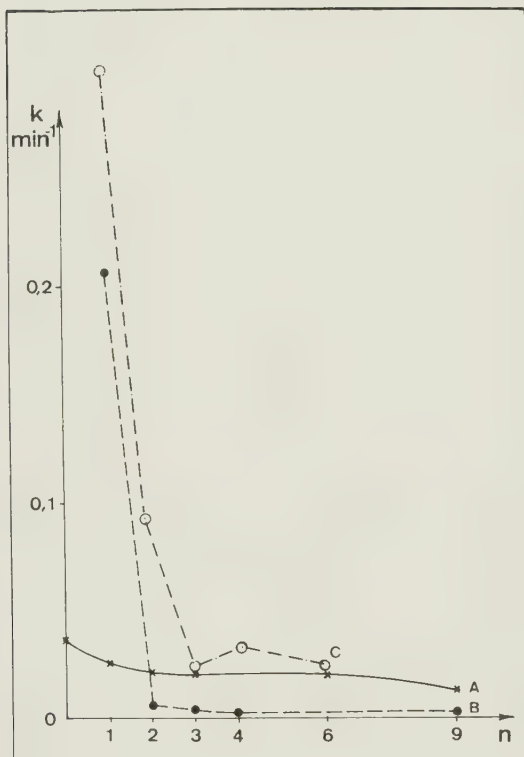


FIG. 7. — Constantes de vitesse de réaction des DMK :  
A : avec la cystéine dans l'éthanol.  
B : avec la cystéine dans les micelles.  
C : avec le benzénethiol dans les micelles en fonction de la longueur de la chaîne des DMK.

Ce schéma ne permet cependant pas d'interpréter la baisse d'activité de l'enzyme vis-à-vis des DMK à longue chaîne sauf dans l'hypothèse où l'engagement de celles-ci dans la structure hydrophobe micellaire modifierait fortement la disposition spatiale du noyau naphtoquinonique vis-à-vis de la surface micellaire. On peut penser alors que l'organisation lipoprotéique de la membrane bactérienne où sont localisées à la fois l'enzyme de méthylation [9] et la DMK substrat [28] serait plus favorable à l'accommodation de la DMK-9 et à son

interaction avec l'enzyme associée à cette structure, ce qui expliquerait la biosynthèse exclusive de ménaquinones à longue chaîne *in vivo*.

Rappelons à ce propos que d'autres ménaquinones à longue chaîne [MK-8 (II-H<sub>2</sub>) et MK-10 (II-H<sub>2</sub>)] ont été trouvées à l'état de traces chez *M. phlei* [29].

D'autres interprétations du fait que la dihydro-ménaquinone-9 est la ménaquinone principale synthétisée par *M. phlei* pourraient être, soit la formation privilégiée d'un alcool à longue chaîne, soit la spécificité propre de l'enzyme d'alkylation entraînant la formation exclusive de desméthyl-ménaquinones à longue chaîne.

#### Remerciements.

Nous remercions M. E. Lederer pour l'intérêt porté à ce travail qui a bénéficié d'une subvention de la Fondation de la Recherche médicale, Paris, et d'une subvention du CEA pour l'achat de composés radioactifs.

#### RÉSUMÉ.

La DMK-méthylase s'est montrée étroitement spécifique vis-à-vis du noyau naphtoquinonique et du premier chaînon isoprénoïde *trans*. Toute modification dans cette partie de la molécule de substrat entraîne généralement une perte complète d'activité. Par contre la méthylase est beaucoup moins spécifique vis-à-vis du reste de la chaîne, ce qui est interprété comme résultant d'une interaction nécessaire entre l'enzyme et un substrat dissous dans des micelles phospholipidiques. L'implication des phospholipides dans le fonctionnement de la C-méthylase est discutée en relation avec sa localisation membranaire.

#### ZUSAMMENFASSUNG.

Die DMK-Methylase zeigt sich dem Naphtochinonring und dem ersten *trans*-Isoprenkettenglied gegenüber streng spezifisch. Jede Modifikation innerhalb dieses Teils des Substratmoleküls hat im allgemeinen einen gänzlichen Aktivitätsverlust zur Folge. Hingegen ist die Methylase dem Rest der Kette gegenüber wesentlich weniger spezifisch, was als Ergebnis einer notwendigen Wechselwirkung zwischen dem Enzym und einem Substrat, das in den Phospholipidmicellen aufgelöst ist, gedeutet wird. Die Verwicklung der Phospholipide in die Tätigkeit der C-Methylase wird in beziehung zu ihrer Lokalisierung in der Membran erörtert.

#### REFERENCES.

1. Birch, A. H., Eliot, D. & Penfold, A. R. (1954) *Aust. J. Chem.*, **7**, 169.
2. Rudney, H. & Parson, W. W. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 3137.
3. Jackman, L. M., O'Brien, I. G., Cox, G. B. & Gibson, F. (1967) *Biochim. Biophys. Acta*, **141**, 1.
4. Threlfall, D. R. & Whistance, G. R. (1968) *Biochem. J.*, **109**, 577.

5. Martius, C. & Leuzinger, W. (1964) *Biochem. Z.*, **340**, 304.
  6. Guérin, M., Azerad, R. & Lederer, E. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 2105.
  7. Jauréguiberry, G., Lenfant, M., Das, B. C. & Lederer, E. (1966), *Tetrahedron*, suppl. 8, part I, 27.
  8. Samuel, O. & Azerad, R. (1969) *FEBS Letters*, **2**, 336.
  9. Catala, F., Azerad, R. & Lederer, E. (1970) *J. Internat. Vitaminol.*, **40**, 363.
  10. Catala, F. & Azerad, R. Résultats inédits.
  11. Azerad, R., Bleiller-Hill, R., Catala, F., Samuel, O. & Lederer, E. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27**, 253.
  12. Azerad, R. & Samuel, O. (1972) *Biochimie*, **54**, 271.
  13. Lester, R. L., White, D. C. & Smith, S. L. (1964) *Biochemistry*, **3**, 949.
  14. Burrell, J. W. K., Garwood, R. F., Jackman, L. M., Oskay, E. & Weedon, B. C. (1966) *J. Chem. Soc.*, 2144.
  15. Scherrer, F. & Azerad, R. (1970) *Experientia*, **26**, 1201.
  16. Mamont, P., Cohen, P., Azerad, R. & Vilkas, M. (1965) *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2513.
  17. Fieser, L. F., Campbell, W. P., Fry, E. M. & Gates, M. D. (1939) *J. Amer. Chem. Soc.*, **61**, 3216.
  18. Tishler, M., Fieser, L. F. & Wendler, N. L. (1940) *J. Amer. Chem. Soc.*, **62**, 2866.
  19. Langemann, A. & Isler, O. (1965) in *Biochemistry of Quinones* (R. A. Morton Ed.) Academic Press (London and New York), 121.
  20. Popják, G., Rabinowitz, J. L. & Baron, J. M. (1969) *Biochem. J.*, **113**, 861.
  21. Akamatsu, Y. & Nojima, S. (1965) *J. of Biochem. (Japan)*, **57**, 430.
  22. Lucy, J. A. (1968) in *Biological membranes* (D. Chapman Ed.), Academic Press (London and New York), p. 233.
  23. Lucy, J. A. & Glauret, A. M. (1964) *J. Mol. Biol.*, **8**, 727.
  24. Finean, J. B. & Robertson, J. D. (1958) *Brit. Med. Bull.*, **14**, 267.
  25. Fieser, L. F. & Turner, R. B. (1947) *J. Amer. Chem. Soc.*, **69**, 2335.
  26. Nickerson, W. J., Falcone, G. & Strauss, G. (1963) *Biochemistry*, **2**, 537.
  27. Nakai, N. & Hase, J. (1968) *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, **16**, 2334.
  28. White, D. C. (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1387.
  29. Campbell, I. M. & Bentley, R. (1968) *Biochemistry*, **7**, 3323.
-









